

## Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 3: Metode netralisasi



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Peralatan .....	2
4 Bahan .....	2
5 Prosedur .....	2
6 Pembacaan hasil .....	3
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi .....	4
Bibliografi .....	6





## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 3: Metode netralisasi.

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.



## Identifikasi *Rhabdovirus carpio* - Bagian 3: Metode netralisasi

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan identifikasi *Rhabdovirus carpio* dengan metode netralisasi.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **aliquot**

tiap bagian yang mempunyai hubungan kuantitatif terhadap keseluruhan atau terhadap bagian lain dari keseluruhan yang sama. contoh plasma atau serum yang diambil untuk menentukan komposisi kuantitatif keseluruhan itu

#### 2.2

##### **antibodi**

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari sel *limfoid* (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut. Antibodi digolongkan menurut cara kerjanya, seperti *agglutinin*, *bakteriolisin*, *hemolisin*, *opsonin*, *presipitin*, dan lain-lain

#### 2.3

##### **asam nukleat**

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya yang dapat berupa DNA (asam *deoksiribonukleat*) atau RNA (asam *ribonukleat*)

#### 2.4

##### **carrier (pembawa)**

suatu individu yang dalam tubuhnya mengandung organisme spesifik suatu penyakit tanpa menunjukkan gejala-gejala dan mampu membawa infeksi

#### 2.5

##### **cytophatic effect (CPE )**

efek yang ditimbulkan berupa perubahan patologis dalam kultur sel

#### 2.6

##### **infeksi sistemik**

tipe infeksi dari suatu penyakit yang menginfeksi seluruh tubuh

#### 2.7

##### **penyakit viral**

penyakit yang disebabkan oleh virus

#### 2.8

##### **preparasi**

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

#### 2.9

##### ***Rhabdovirus carpio***

merupakan jasad penyebab penyakit dari *spring viraemia of carp* (SVC)



## 2.10

***spring viraemia of carp (SVC)***

penyakit ikan yang disebabkan oleh infeksi *spring viraemia of carp virus* (SVCV), termasuk dalam famili *Rhabdoviridae* dan secara sementara dimasukkan dalam genus *Vesiculovirus*, merupakan *single strand* (ss) RNA virus dengan polaritas negatif, yang dapat menyebabkan infeksi sistemik

## 2.11

**uji netralisasi**

uji pengikatan antigen oleh antibodi sehingga antigen menjadi tidak aktif

**3 Peralatan**

- a) inkubator;
- b) mikropipet 20 µl - 200 µl dan 100 µl – 1 000 µl;
- c) mikroskop fase kontras, mikroskop *inverted*;
- d) sentrifus (minimal 5 000 rpm);
- e) *wellplate*.

**4 Bahan**

- a) cairan antibodi spesifik terhadap *spring viraemia of carp virus* (SVCV);
- b) *fetal calf serum* (FCS);
- c) larutan kristal violet 1 % dalam etanol 20 %;
- d) media kultur yang mengandung *cytopathic effect* (CPE) virus yang akan diuji;
- e) metanol p.a/GR;
- f) mikrotube 1500 µl;
- g) mikrotip 200 µl dan 1 000 µl;
- h) *trypsin- ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA);
- i) tabung sentrifus 15 ml.

**5 Prosedur**

- a) panen media kultur yang mengandung CPE dengan menggunakan *trypsin- ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) goyangkan *flask*. Kemudian tuang isinya ke dalam tabung sentrifus 15 ml.
- b) sentrifugasi dengan kecepatan 5 000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C.
- c) encerkan media virus  $10^{-2}$  sampai  $10^{-4}$ .
- d) buat *aliquot* ( 200 µl).
- e) campurkan cairan virus (*aliquot*) dengan volume yang setara dengan cairan antibodi spesifik terhadap *Rhabdovirus carpio*.
- f) lakukan secara bersamaan uji netralisasi terhadap strain virus *homolog* (netralisasi positif) dan strain virus *heterolog* (netralisasi negatif).
- g) inkubasikan semua campuran tersebut pada suhu 20 °C – 22 °C selama 1 jam.
- h) transfer *aliquot* masing-masing campuran di atas pada *monolayer* sel (dua ulangan untuk satu konsentrasi virus).
- i) inkubasikan selama 30 menit sampai 1 jam pada suhu 15 °C – 20 °C gunakan 50 µl inokulum pada 24 *well plate* atau 12 *well plate*.
- j) tambahkan media kultur sel yang mengandung 2 % FCS yang telah di-*bufer* pada pH 7,3 - pH 7,6, pada tiap sumuran dan inkubasikan pada suhu 20 °C – 22 °C.
- k) periksa kultur sel terhadap munculnya CPE.



- l) Pembacaan hasil dilakukan segera setelah munculnya CPE pada kontrol non netralisasi (kontrol tanpa antibodi).
- m) buang media kultur sel dan warnai *monolayer* dengan larutan kristal violet 1 % dalam etanol 20 %.

## 6 Pembacaan hasil

- Virus yang diuji diidentifikasi sebagai SVCV bila CPE tidak terbentuk atau terjadi perlambatan pertumbuhan pada kultur sel yang telah diberi campuran suspensi virus dan antibodi spesifik SVCV. Sementara CPE muncul pada kultur sel yang lain (yang tidak diberi antibodi).
- Bila tidak terjadi netralisasi terhadap SVCV, harus dilakukan uji IFA (*Indirect Fluorescent Antibody*) terhadap sampel yang dicurigai, uji ELISA atau uji berdasarkan asam nukleat spesifik SVCV.





**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan media dan pereaksi**

**A.1 Phospat buffer saline (PBS)**

Bahan:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Akuades sampai	1 000 ml

Cara membuat:

- larutkan semua bahan diatas ke dalam 800 ml akuades.
- aduk hingga semua bahan larut.
- kemudian sesuaikan pH 7,2.
- tambahkan akuades sampai 1 000 ml.
- sterilkandengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

**A.2 Media kultur *fathead minnow* (FHM) atau *epithelioma papulosum cyprini* (EPC)**

Cara membuat:

- larutkan 0.3 g L-Glutamin *powder* dalam 10 ml akuades untuk membuat larutan 3 % L-Glutamin.
- larutkan 7,5 g NaHCO<sub>3</sub> dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>.
- campurkan 487,5 ml akuades, 4,7 g MEM bubuk, 7,5 ml 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>, 5 ml 3 % L-Glutamin, dan 25 ml *fetal bovine serum* (FBS).
- aduk hingga semua bahan terlarut.
- Masukkan ke dalam botol.
- sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

**A.3 Buffer 10 X Tris (0.5 M)**

Cara membuat:

- Masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass*, tambahkan Tris *base* 60,5 g dan 90 g *sodium chloride*.
- Tambahkan 30 ml *hydrochloric acid* 37 % untuk mendapatkan pH 7,8.
- Kemudian ditambahkan akuades hingga mencapai volume 1 l.

**A.4 Phosphate buffered saline-tween (PBST)**

Cara membuat:

Untuk setiap 1000 ml PBST, campurkan 999,5 ml PBS pH 7,2 dengan 0,5 ml Tween 80.



**A.5 Buffer proteinase K**

Cara membuat:

- larutkan 7,455 g KCl dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan 1 M KCl,
- larutkan 6,05 g Tris base dalam 100 ml akuades, tambahkan 21 ml *hydrochloric acid* 37 % dan sesuaikan pH 8,3 untuk membuat larutan 0,5 M Tris-HCl pH 8,3,
- campurkan 91,5 ml akuades, 5 ml 1 M KCl, 3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,3, dan 0,5 ml Nonidet P-40-
- tambahkan 0,5 mg *proteinase K* untuk setiap ml campuran di atas, sehingga bufer mempunyai kadar akhir 50 mM KCl, 15 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,5 % *Nonidet P-40* dan 0,5 mg/ml *proteinase K*.

**A.6 EDTA-PBS (-)**

Cara membuat:

- larutkan 4 g NaCl; 0,1 g KCl; 1,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; dan 0,1 g  $\text{EDTA}_2\text{Na}$  dalam 400 ml akuades.
- setelah larut, tambahkan akuades hingga volumenya menjadi 500 ml.
- masukkan ke dalam botol.
- sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

**A.7 Trypsin-ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)**

Cara membuat:

- larutkan 25 g *trypsin* dalam 1 000 ml 0,85 % NaCl untuk membuat larutan 2,5 % *trypsin*.
- campurkan 4 ml 2,5 % *trypsin* dengan 96 ml EDTA-PBS (-)



## Bibliografi

Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. & Winton, J.R. 2002. *Spring viremia of carp (SVC)*. *Dis. aquat. Org.* 52: 261–272.

OIE, 2011. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*. Office des International des Epizooties (OIE).

Sano, M., Nakai, T. & Fijan, N. 2011. *Viral Diseases and Agents of Warmwater Fish*. In: Woo P.T.K. & Bruno D.W. (eds). *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections*. 2<sup>nd</sup> ed. CAB International, UK. 166–244.

